

# Polyfenoler – mer enn bare antioksidanter?

av

Sigrid Kirkeby Risøe

Obligatorisk prosjektoppgave på  
det medisinske profesjonsstudium

Veileder Petter Kirkeby Risøe



Det medisinske fakultet,  
Universitetet i Oslo.

2010

---

## Forord

Det hadde vært fint å påstå at denne oppgaven ble skrevet kun av undertegnede, men dette ville være en grov overdrivelse og en underkjennelse av alt arbeidet mine forskerkolleger har lagt ned. Først og fremst er det en laginnsats av en dyktig gruppe forskere - Petter S. K. Risøe, Johanna Ågren, Yin Yong og undertegnede - som har drevet dette prosjektet frem. En takk også til Lyngstadaas et al som har hjulpet oss med analyser av cytokiner, og til Avdeling for medisinsk biokjemi på Rikshospitalet som har analysert blodprøver for biokjemiske markører.

En egen takk går også til min min arbeidsomme og fremragende veileder Dr. Petter S. K. Risøe. Selv under stort press har han klart å rydde plass i en hektisk timeplan til kyndig veiledning av sin oppgavestudent. Jeg står i stor takknemlighetsgjeld til min veileder for den ganske formidable innsatsen han har lagt ned i denne oppgave.

---

# Innhold

## Oppgavetittel

Forord	2
Innholdsfortegnelse	3

## I. Teoretisk bakgrunn

1. Bakgrunn	4
a. Polyfenoler gjennom historien	4
b. Sepsis	5
c. Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)	5
2. Syklisk AMP (cAMP) budbringersystemet	6
a. cAMPs funksjon i intracellulær signallering	6
b. cAMPs rolle i inflammasjon	7
c. cAMP og dysregulering ved sepsis	8
3. Polyfenolenes egenskaper og rolle i inflammasjonsprosesser	9
a. Antioksidanthypotesen	9
b. Polyfenoler som modulerende faktor i intracellulære cAMP-nivåer	10
c. Et eksempel på flavanoid isoform-spesifikk inhibisjon av en viktig immunmodulator	10

## II. Eksperimentet

4. Hypotese	12
5. Metode	12
a. Cecal ligation and puncture	12
b. Protokoll for CLP med intervensjon	13
6. Resultater	16
7. Diskusjon	17
a. Spekulasjoner rundt den manglende effekt	17
8. Diskusjon	18

## III. Referanser

---

## I. Teoretisk bakgrunn

### Bakgrunn

#### *Polyfenoler gjennom historien*

Fra tidlig historisk tid har vin og en planterik kost vært sett på som viktige bidragsyttere til et sunt liv. Da den bibelske figuren Daniel ble tatt til fange og ført til hoffet under kong Nebuchadnezzar av Baylon, forslo han et kontrollert klinisk forsøk for å undersøke effekter av en vegetarisk diett, og evidens sprunget ut av denne studien førte til endringer i regimets tilnærming til folkehelse (Daniel 1:11-16). I følge dagens kunnskap antas de viktigste komponentene for denne helsefremmende effekten å være polyfenolene. Et stort antall epidemiologiske og kliniske studier demonstrerer klar relasjon mellom polyfenolinntak og sykdomsbyrde. Kvantitativt viktigst er den observerte reduksjonen i insidensen av hjertekarsykdom [44] og kreftsykdommer [12], de to mest fremtredende livstruende sykdommer i den utviklede verden. Positive effekter sees også ved en lang rekke andre kroniske tilstander [52,69]. Felles for alle disse patologiske prosessene er tilstedeværelsen av lavgradig, kronisk inflammasjon som forårsaker degenerative og mutagene skader på cellene. Polyfenoler i dietten antas å demme opp for denne skaden ved å redusere utskillelsen av et mylder av destruktive mediatorer som frigjøres av våre immunceller, og derfor begrense utviklingen av livstilsykdommer der kronisk inflammasjon er en viktig etiologisk faktor.

Kunnskapen om polyfenolenes virkning når immunsystemet er utsatt for en ekstraordinær stressbelastning er mangelfull. Blodforgiftning, eller sepsis, er en tilstand av slik immunologisk tilleggsbelastning hvor det er holdepunkter for at de intracellulære sykliske adenosinmonofosfat (cAMP) nivåene er nedregulert. Det er tidligere vist at ligander som øker de intracellulære nivåer av cAMP gjennom å øke aktiviteten i adenylyl cyclaser (ACs) (f.eks. noradrenalin/adrenalin, vasopressin, og adrenomedullin) kan ha gunstige effekter ved sepsis [19,28,33]. Denne oppgaven hevder at dette signalsystemet spiller en større rolle i polyfenolers helsebringende effekt enn tidligere antatt. Selv om oppgaven tar utgangspunkt i en immunologisk ekstremsituasjon er de samme mekanismer antatt å gjøre seg gjeldende i

inflammasjonstilstander av mer kronisk karakter, som ved koronar hjertesykdom og autoimmunitet.

### *Sepsis*

Sepsis er en alvorlig medisinsk tilstand karakterisert av systemisk inflammasjon, ofte utløst av infeksjon, og hvor resultatet kan være tap av organfunksjon og død. Mortaliteten av alvorlig sepsis med organsvikt er rapportert å ligge mellom 30-50 % [43]. Sepsis er også korrelert med høyere dødlighet av ikke-septiske årsaker, selv etter at man korrigerer for andre komorbide faktorer, opp til fem år etter den septiske episoden [55].

I løpet av 1980-tallet ble det klart at manifestasjonen av sepsis ikke kunne forklares gjennom den direkte effekten av patogene toksiner alene, og at vertsresponsen måtte inkorporeres som en viktig faktor ved den observerte selv-oppløsning affiserte pasienter gjennomgikk. Det ble klart at en overdrevet og uproposjonert proinflammatorisk cytokinproduksjon setter i gang en kaskade av leukocyttinfiltrasjon, endotel dysfunksjon, sirkulatorisk kollaps, hemorragisk nekrose, multiorgansvikt og andre uheldige prosesser [14].

### *Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)*

SIRS er definert ved tilstedeværelse av to eller flere av følgende kriterier; 1) hyper- eller hypotermi, 2) tachycardi, 3) tachypne eller hyperventilering, eller 4) leukocytose eller leukopeni [8]. Årsaken til dette syndromet kan variere mellom infeksjøs eller ikke-infeksjøs årsaker, eller mer spesifikt; En vanlig tommelfinger-regel er å tenke på sepsis som SIRS med infeksjon, men SIRS kan også utløses av ikke-infeksjøs tilstander med stor vevsskade, e.g. brannskader, pankreatitt, traume eller kirurgi [59]. Da spennet mellom tilstander som kan føre til SIRS er stort, følger det naturlig at det er ikke den skadelige hendelsen som fører til syndromet, men kroppens respons på hendelsen. Forståelsen av hvordan inflammasjonen opprettholdes, selv etter at faren er over, er en av nøklene for å forstå den unike patofysiologien som preger syndromet. I følge Lewis Thomas' hypotese kan immunsystemets aktivitet forklares ved en initiell hyperinflammasjon, som varierer i alvorlighetsgrad etter flere indre og ytre faktorer. For pasienter der infeksjonen eller skaden fjernes raskt, vil den påfølgende responsen være liten og neglisjerbar. Hvis infeksjonen/skaden derimot ikke fjernes, vil kroppen som respons på en initialt voldsom proinflammasjon i systemet gå over i

et lengere anti-inflammatorisk motsvar – compensatory antiinflammatory response syndrome (CARS) [34]. Denne hypoinflammatoriske tilstanden vil uten korreksjon kunne føre til ny infeksjon ("second hit"), mutiorgansvikt og død.

I dag ser vi på overdreven proinflammatorisk immunmediatorproduksjon som drivkraften bak patofysiologien ved sepsis, fulgt av en hypoinflammasjon som svekker kroppens forsvar og som ukontrollert kan ha fatal utgang. Selv om kunnskapsgrunnlaget for forståelsen av sykdommen har utviklet seg enormt siden 1970-årene, er behandlingen av sepsis forblitt mer eller mindre den samme over de siste tre tiår – god behandling ansees fortsatt å være adekvat væsketilførsel, blodkulturer, lokalisering av infeksjonsfokus, bredspektret antibiotika for å bekjempe bakteriell infeksjon og støttebehandling ved en Intensivenhet [24].

### **Syklisk AMP (cAMP) budbringersystemet**

#### *cAMPs funksjon i intracellulær signallering*

Hver celle og hvert organ i kroppen er avhengig av det intracellulære cAMP budbringersystemet for å utføre essensielle funksjoner. Syklisk AMP (cAMP) produseres fra adenosin trifosfat (ATP) av adenylyl cyclase (AC), og blir konvertert til inaktivt monofosfat (AMP) ved en prosess katalysert av cAMP forsodiesteraser (PDE) [15]. Aktiviteten av AC og PDE enzymene regulerer nivåene av cAMP i cellen. Flere isoformer av AC og PDE eksisterer, hver med distinkt ekspresjon og regulatorisk profil, subcellulære lokalisasjoner og funksjoner [20,48]. De isoform-spesifikke rollene er fremdeles ufullstendig kartlagt. Adenylyl cyclaser er, med ett unntak, membranbundede enzymer som reguleres av ekstracellulære signaler gjennom transmembran G-protein koblede reseptorer (GPCR) og G-proteiner [20]. Forenklet kan man si at G-proteiner frigitt av en aktivert reseptor kan enten stimulere (Gs) eller hemme (Gi) GPCR ligander, som igjen vil finstyre cAMP-produksjon/-nedbrytning i cellen [42]. Hundrevis av forskjellige GPCR eksisterer, men nye studier har avdekket at interaksjonene mellom de enkelte GPCR og AC ved cellemembranen er svært spesifikke, og at PDE og cAMP målproteiner assosierer med disse membrankompleksene til definerte subcellulære avdelinger hvor lokalisert cAMP kan utøve sin spesifikke effekt [66]. De mest kjente stimulatorer for økt cAMP-produksjon er nikotin, adrenalin, noradrenalin, histamin, serotonin og enkelte prostaglandiner, mens eksempler på Gi-koblede GPCR ligander er visse kjemokiner og leukotriener [39]. De rundt 10 isoformer av AC kontres av nærmere 40

forskjellige PDE [32]. Målet for cAMP er hovedsakelig cAMP-avhengige protein kinase (PKA) isoformer, cAMP-regulerte ionekanaler og utvekslingsproteinene som aktiveres av cAMP (Epacs) [9,66]. Effektorproteinene utøver en myriade av forskjellige oppgaver i cellen, inkludert reisverk-, adaptor- og ankerfunksjoner, noe som bidrar til å øke cAMP-systemets mangfold og kompleksitet.

#### *cAMPs rolle i inflammasjonsresponsen*

Uspesifikk manipulering av cAMP-nivåer intracellulært har vist seg å dempe naturlige immunfunksjoner i makrofager, monocytter og nøytrofile ved å modulere tre nøkkelfunksjoner; produksjon av inflammasjonsmediatorer, fagocytose, og intracellulær fordøyelse av fagocyterte patogener [63].

Det intracellulære sykliske AMP systemet trer frem som en nøkkelspiller når det kommer til å avgjøre immuncellenes respons til aktiverende stimuli; med fleksibilitet og presisjon modulerer den frigjøringen av proinflammatoriske og antiinflammatoriske mediatorer (gjennomgått i [18,64]). Grov manipulasjon av cAMP-signalet har demonstrert en potente evne til å redusere endotoksin-mediert produksjon av proinflammatoriske mediatorer, herunder tidlig-fase stimulerende inflammasjonsmediatorer som tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$ , granulocyttiltrekkende kjemokin interleukin (IL)-8, cytotoksisk aktiverende responser i T- og NK-celler, IL-12, induserbar NO syntetase (iNOS), og akutfaseresponsens hovedinduktor, IL-6 [11,17]. Samtidig stimuleres produksjonen og frigjøringen av antiinflammatoriske cytokiner som IL-10 [3,40].

cAMP signaliseringskjeden modulerer inflammasjon ved å påvirke et bredt spekter av andre immuncellefunksjoner: dempning av infiltrasjon av immunceller i vevet, samt bactericide og cytotoksiske responser i det medfødte immunforsvaret [2,11,67].

Prinsippet om selektiv PDE isozyminhibisjon har allerede ført til noen av farmakoindustriens største kommersielle suksesser, hvorav den mest kjente er medikamentet sildenafil for erektil dysfunksjon. Senere litteraturgjennomganger påpeker imidlertid også det farmakologiske potensialet ved å manipulere produksjons-siden av cAMP-balansen, og

selektivt isoformspesifikke modulering av cAMP second messenger systemkomponentene er betraktet som et lovende felt innen medikamentutvikling [50,54].

I endotoksiske hunder kan man observere nedregulering av globale cAMP nivåer [30], og intravenøs injeksjon av cAMP-analoger øker minuttvolum, normaliserer urinvolum, bedrer systemisk vasokonstriksjon og minsker kjemiske markører for endotoksisk sjokk [47,72]. I tillegg til dette vil plasma fra septiske pasienter hemme monocyttenes cAMP-produksjon etter stimulering med G-proteinkoblede reseptoragonister, noe som indikerer at septisk plasma inneholder komponenter som hindrer cAMP-syntese [6].

#### *cAMP og dysregulering ved sepsis*

Fra 1970-tallet har det vært klart at hepatiske cAMP-nivåer er lavere ved endotoksemi-modeller hos rotter [16,73]. Også abnormale nivåer har vært registrert i hundelever, samt reduserte responser fra AC på forskjellige GCPR-ligander [30,31]. Gjennom studier på 1990-tallet ble det klart at ikke bare er cAMP-nivåene senket hos septiske pasienter, men i tillegg er også cellens responsivitet til stimulerende ligander senket, attribuert til en heterolog desensitivering av AC-aktivitet [7]. Ved å studere cAMP-regulering hos knock-out mus er det blitt klart at inaktivering av forskjellige mekanismer som øker intracellulære cAMP-nivåer er av betydning for utviklingen av SIRS og sepsis. Mangel på cAMP-induserende adenosine 2A (A2A) eller hypofysenhormonet adenylyl cyclase activating peptide (PACAP) reseptorer gjør musene uvanlig mottakelige for å utvikle sepsis ved infeksiose belastninger [22]. Samtidig er det rapportert at mangel på PDE-isoformen 4B, som bryter ned cAMP, økte overlevelsen hos knock-out mus, selv etter en høydose intraperitoneal LPS-injeksjon, og reduserte makrofagial TNF  $\alpha$ -produksjon med >50 % [36].

Også som virulensfaktor er cAMP-nedregulering av betydning, noe som ytteligere understreker cAMPs immunmodulerende effekt. Den mest kjente bakterien som aktivt bruker cAMP for å invadere vertsorganismen er *Vibrio cholerae*. Et intracellulært toksin fra bakterien katalyserer ADP-ribosylering av  $\alpha$ -subenheten av Gs-proteinet, som fører til økede intracellulære nivåer av cAMP. Sluttresultatet er en massiv eksport av vann til tarmlumen, og en påfølgende alvorlig diare [68]. *Vibrio cholerae* er også en potent hemmer av fagocytose,



intracellulær baktericid, produksjon av proinflammatoriske mediatorer og chemotakse i myeloide celler [10,45,46].

## **Polyfenolenes egenskaper og rolle i inflammasjonsprosesser**

### *Antioksidanthypotesen*

Polyfenoler, en variert gruppe sekundære metabolitter som er allestedsnærværende i planter, utgjør omtrent 20% av karbonet som fikseres av fotosyntesen og det finnes troligens et sted mellom 50.000 og 100.000 unike varianter [69]. Strukturelt karakteriseres disse av en eller flere aromatiske seks-karbon ringer med to eller flere fenolske hydroxyl grupper, og de kan deles i fem store kategorier. Blant dem finner man en stor og variert gruppe kalt flavanoider som har vært gjenstand for spesiell interesse grunnet deres fordelaktige egenskaper med hensyn på menneskelig helse. Det har vært spekulert om disse kan spille en rolle i vertsforsvaret og som reparasjonsmekanismer hos planter ettersom de syntetiseres i respons på stress fra omgivelsene, som sårskade, infeksjon og stråling.

I 1987 la Gey frem sin antioksidanthypotese, og denne fikk raskt status som hegemonisk forklaring på hvorfor polyfenoler i kosten har en dokumenterbar positiv effekt på livsstilsykdommer [29]. Kort fortalt går hypotesen ut på at kosttilførte "små-molekyl" antioksidanter (f.eks. urat, askorbat og tocoferoler) motvirker frie oksygenradikaler frigitt under en inflammasjon, et konsept utledet av deres in vitro antioksidantegenskaper. Da det imidlertid senere ble observert at polyfenoler ikke ser ut til å ha noen signifikant konvensjonell antioksidantkapasitet in vivo grunnet dens begrensede biotilgjengelighet, foreslo flere studier at de induserer oppregulering av endogene antioksidant enzymer og således utøver en "indirekte antioksidant effekt" [65]. Andre forfattere har påpekt at polyfenoler kan akkumulere i vev i høyere konsentrasjoner og gjennom dette tenkes å utøve lokale antioksidanteffekter [41].

Mangelen på en godt karakterisert, spesifikk in vivo mekanisme for deres helseeffekt, til tross for utstrakt forskning over flere år, har ført til at enkelte i feltet tar til orde for at andre, ikke-antioksidante mekanismer muligens spiller en rolle [41,65,71]. Det er foreslått at polyfenoler også kan være i stand til å interagere med intracellulære signalkaskader for å modulere gentranskripsjon, påvirke ekspresjon av overflatemolekyler og virke inn på intracellulær inflammasjonskommunikasjon gjennom cytokinregulering [71].

### *Polyfenoler som modulerende faktor i intracellulære cAMP nivåer*

At polyfenoler kan virke som modulatorer av intracellulære cAMP-nivåer gjennom inhibisjon av fosfodiesteraser ble oppdaget så tidlig som i siste halvdel av 1970-tallet [4,27,60]. Et allment studert eksempel er inhibisjonen av blodplateaggregasjon ved å heve intracellulære cAMP-nivåer gjennom polyfenol-mediert PDE inhibisjon [5,23,53]. En nylig review summerer eksperimentelle studier som dokumenterer det PDE-hemmende potensialet til et bredt spekter av plantepolyfenoler [56]. Protein-polyfenol kompleksdannelse er avhengig både av 3-dimensjonal struktur og elektrostatiske interaksjoner, og plasseringen av hydroxylering på forskjellige fenolringer synes viktig for deres PDE-hemmende potensiale. For eksempel, C-5 og C-7 hydroxylering blir rapportert som vitalt for å inhibere det predominerende isozymet i de fleste inflammatoriske celler, PDE4 [51,56]. Polyfenolet resveratrol rapporteres også å påvirke et oppstrøms sete i signalkaskadene ved å aktivere adenylyl cyclase direkte [25].

Vår hypotese er at modulering av det viktige intracellulære cAMP budbringersystemet, primært gjennom inhibisjon av de cAMP-hydrolyserende enzymene fosfodiesteraser (PDE), spiller en betraktelig viktigere rolle for å frembringe de gunstige helseeffektene korrelert med polyfenolinntak enn tidligere antatt. Hvis dette stemmer, impliserer denne hypotesen at andre strukturelle karakteristika av polyfenolene, som deres antatte molekylære passform til fosfodiesterasenes katalyserende seter, kan være viktige når man evaluerer dem som terapeutiske agens ved behandling av sepsis.

### *Et eksempel på flavanoid isoform-spesifikk inhibisjon av en viktig immun regulator*

For å gi et illustrativt eksempel av en spesifikk molekylær mekanisme avledet av vår hypotese, vil vi utdype den hypotetiske sammenhengen mellom inflammasjon, PDE4B og flavonoidet genistein. Markert økt overlevelse og signifikant lenger overlevelsestid har vært rapportert i PDE4B knock-out mus etter lipopolysakkarid-indusert sjokk utløst av intraperitoneal injeksjon, såvel som redusert frigivning av og respons på en hel rekke proinflammatoriske mediatorer i makrofager og nøytrofile [1,36]. Data-simulert røntgenkrystallografisk modellering av flavanoidet genistein forutsier at det passer i det sykliske nukleotidbindingssete av PDE4B [51]. Ved kompetitiv inhibisjon av PDE4Bs katalytiske sete, antas genistein å moduleres budbringersignalet gjennom hemmet cAMP-nedbrytning, noe som leder til nedsatt inflammasjon. I tråd med hypotesen prediksjoner, har

genistein vist seg eksperimentelt effektivt i inhibisjon av PDE4 isozymaktivitet [37], og dyreforsøk med beslektede flavonoider har vært rapportert å inhibere PDE isozymer på en tilsvarende måte.

## II. Eksperimentet

### Hypotese

Vår hypotese er at polyfenolenes modulering av det intracellulære cAMP-budbringersystemet har terapeutisk potensiale ved sepsis, primært gjennom spesifikk inhibisjon av ulike isotyper av cAMP-nedbrytende fosfodiesterasene (PDE). Denne selektive inhiberingen innvirker på nøkkelfunksjoner i det intracellulære signaleringssystemet, slik at tilførsel av polyfenoler vil virke inn på ulike nøkkelfunksjoner i immunceller. Dette fører igjen til minsket inflammasjonsreaksjon, noe som beskytter verten mot den hyperinflammasjon som danner grunnlaget for utviklingen mot SIRS og septisk sjokk. I en eksperimentell CLP-modell hos rotter vil polyfenolene resveratrol og genistein etter denne hypotesen gi en beskyttende virkning mot det hyperdynamiske stadiet av sepsis.

### Metoder

#### *a. Cecal ligation and puncture.*

Cecal ligation and puncture (CLP) metoden er utviklet av prof. Irshad H. Chaudry, og regnes som gull-standard innen polymikrobiell sepsis [13,21,57]. Mange viable alternativer finnes, som endotoxemimodellen, infusjon av levende organismer, bruk av irritanter og abscessdannelse i ekstremitetene [26,49,70], men tilstandene som oppnås kan være svært ulik karakteristika for den septiske pasient. Endotoxemimodellen fører til et kort og intenst sykdomsforløp, med tidlig død som et vanlig enderesultat, og produserer ofte signifikante og lett reproducerbare resultater. Ulempen med denne metoden er at den i liten grad kan sammenliknes med den vanligvis mer snikende debut av humansepsis, og det er derfor ikke selvsagt at man kan overføre disse resultatene til kliniske forsøk [49].

CLP-metoden simulerer ruptur av appendix (eller liknende traume i tarmen), og lar multiple bakterietyper invadere peritonealhulen mer eller mindre fritt. For å redusere variabiliteten mellom dyrene må tarminnholdet utliknes ved å faste dyret 12-18 timer før operasjon. Lengden av caecum som liggeres, samt antall punksjoner og nålstørrelse styrer graden av sepsis [58]. En dråpe fecalt materiale deponeres i peritonealhulen for å sikre åpen

kommunikasjon mellom tarm og peritoneum. Dyret resusciteres etter inngrepet ettersom dette fasiliterer den tidlige hyperdynamiske fasen av sykdomsutviklingen. Adekvat smertelindring oppnås med buprenorfin subcutant etter endt inngrep og ny dose ti timer etter operasjon. Etter CLP inngrepet vil dyret utvikle symptomer forenlig med sepsis som tachypne, tachycadi og hypotermi, og etter hvert multiorgansvikt og sjokk. Alle dyr eutaniseres ved forsøkets slutt.

CLP-metoden har sin styrke i eksperimentelle studier av behandlingsstrategier for sepsis og septisk sjokk i dyremodeller. Mikrobene som introduseres er vertsendogene og muligheten er tilstede for å finjustere alvorlighetsgraden av sepsis, noe som gjør det mulig å studere akutt så vel som kronisk sepsis [58]. Dette er også metodens svakhet; da utfallet etter en CLP er tett knyttet til flere faktorer ved utførelsen av prosedyren, er konsekvent utførelse av prosedyren en forutsetning for å få sikre og reproducerbare data. For å begrense antallet variabler som affiserer alvorlighetsgraden av inflammasjonen (i.e graden av sepsis i dyret) må prosedyren utføres uniformt gjennom hele forsøket [58]. En systematisk studie på metoden avdekket at CLP-metoden allikevel er å foretrekke over en endotoxemi-modell eller en LPS-modell, da korreksjon av disse svakhetene er mulig; samme kirurg opererer til samme tid hver dag, rottene er fastende for å oppnå størst mulig likhet av tarminnhold og det er et større antall rotter for å utviske individuelle forskjeller [35].

#### *b. Protokoll for CLP med intervensjon*

Basert på tidligere erfaringer med denne modellen ble det utført en analyse av behovet for forsøksdyr, og rottene ble delt i følgende grupper;

1. Sham + vehicle (12 rotter)
2. CLP + vehicle (12 rotter)
3. Sham + resveratrol 10 mg/kg (12 rotter)
4. CLP + resveratrol 10 mg/kg (12 rotter)
5. Sham + resveratrol 30 mg/kg (12 rotter)
6. CLP + resveratrol 30 mg/kg (12 rotter)
7. Sham + genistein 3 mg/kg (12 rotter)
8. CLP + genistein 3 mg/kg (12 rotter)
9. Sham + genistein 10 mg/kg (12 rotter)
10. CLP + genistein 10 mg/kg (12 rotter)

Dyrene ble randomisert til de ulike gruppene, og operasjonene ble foretatt i tilfeldig rekkefølge, dog slik at hver gruppe alltid var representert i en operasjonsserie. Visuelle og olfaktoriske karakteristika ved dyrene i hver gruppe 18 timer etter operasjon gjorde blinding under prøvetakning og organhøsting umulig.

*c. Primære endepunkter*

Systemisk inflammasjon ble vurdert ved analyse av IL-6 og TNF- $\alpha$ , mens organskade ble bedømt ved ALT og kreatinin.

*d. Planlagte analyser (sekundære endepunkter)*

Karakterisere den funksjonelle konsekvensen av fosfodiesterase inhibisjon med hensyn på organ parenchym skade, representert av biokjemiske markører brukt ved Intensivavdelinger, og ved histopatologisk undersøkelse av immuncelle infiltrasjon i lever og lunge;

- I. Vanlige biokjemiske serum markører for inflammasjon og organ skade; CRP, ASAT, ALAT, GT, bilirubin, p-amylase, LDH, t-kolesterol, LDL, urea, kreatinin, cTnT, pro-BNP og glucose
- II. Vurdere lunge og lever histopatologiske skade ved å benytte et scoringssystem basert på å gradere fire kategorier: nekrose, blødning, parenchymal inflammasjons infiltrat og sinusoidal/alveolar inflammasjons infiltrat

Karakterisere det funksjonelle konsekvensene av resveratrol og genistein med hensyn på de hematologiske egenskapene under utviklingen av septisk sjokk ved å måle;

- I. Ekspresjon av ICAM-1 (CD62L) og L-selektin (CD62L) mRNA (normalisert til 18S og  $\beta$ -actin mRNA ekspresjon) ved å bruke RT-PCR
- II. Standard målinger av hematologisk status: fibrinogen, D-dimer, Cephotest, AT-III og INR
- III. Tromboelastiske endringer

Karakterisere effektene av resveratrol og genistein på mer uventede biokjemiske og molekylære markører brukt for å evaluere den patofysiologiske prosessen. Vi planlegger å undersøke;

- I. High-mobility gruppe boks 1 (HMGB-1) ved å bruke et ELISA assay
- II. Ekspresjonsnivåer av ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106), L-selektin (CD62L) og E-selektin (CD62E) mRNA (normalisert til 18S og  $\beta$ -actin mRNA ekspresjon) i homogenisert lever og lunge vev ved å bruke RT-PCR
- III. Ekspresjonsnivåer av bcl-2, bcl-xl, casparase-2, casparase-8, casparase-9 som apoptose markører i homogenisert lunge og lever vev ved å bruke RT-PCR
- IV. Matriks metalloproteinase MMP-2 og MMP-9 i plasma gjennom zymografi
- V. Adenylyl cyclase aktivitet i lever og milt ved å bruke et kommersielt assay
- VI. Fosfodiersterase aktivitet i lever og milt ved å bruke et kommersielt assay

Karakterisere de funksjonelle konsekvensene av resveratrol og genistein med hensyn på pro- og antiinflammatorisk cytokin frigjøring i plasma;

- I. Multipleks-assay av TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 og IL-18

Sammenlikne de funksjonelle konsekvensene av resveratrol og genistein med hensyn på hjerterytme kompleksitet og temperatur;

- I. EKG og temperatur gjennom PhysioTel ETA-F20 implantert telemetri og temperatur transmitter
- II. Hjerterytme kompleksitet gjennom HRV analyse (software fra Dept. of Applied Physics, University of Kupio)

#### *e. Statistiske analyser*

Statistiske analyser ble utført med GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, USA). For analyse av forskjeller mellom behandlingsgrupper ble det benyttet en-faktor ANOVA med Tukey's post-hoc test for multiplert korreksjon. Der ingen signifikant forskjell forelå, ble

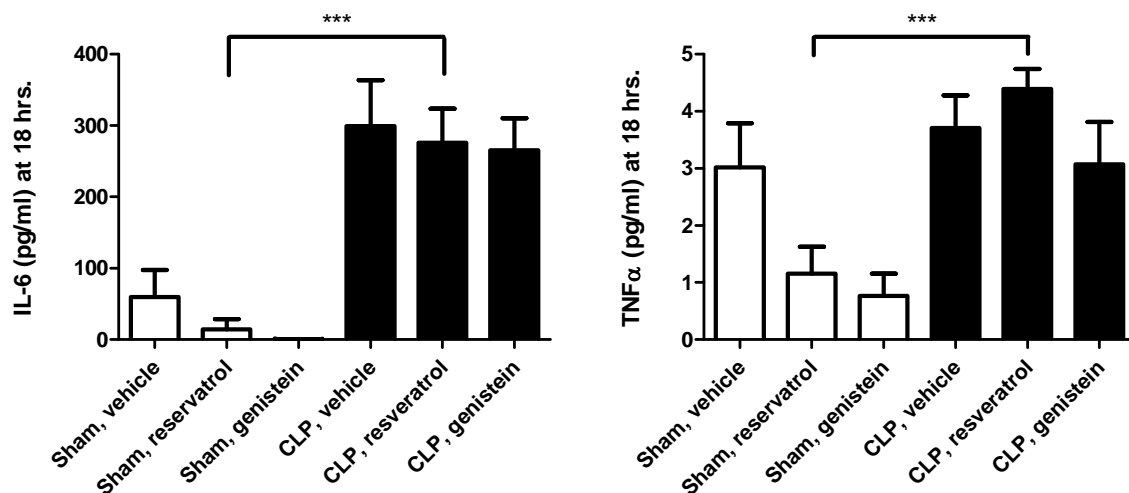
det gjennomført en ytterligere en-faktor ANOVA uten korreksjon for å avgjøre om det var grunnlag for beregning av poolede estimer. Poolede estimer av sham og CLP ble sammenlignet med toalet Student's t-test.

#### *f. Gjennomføring*

Til sammen 89 rotter ble operert og registrert i forsøket, samt 4 kontrollrotter som forble uoperert referanse for klinisk kjemiske markører. 46 rotter ble operert med cecal ligation and puncture (CLP) og 43 forble sham-rotter. Da de primære endepunkter ikke viste tegn til signifikant forskjell ble det besluttet å ikke gå videre med analyse av de sekundære endepunktene.

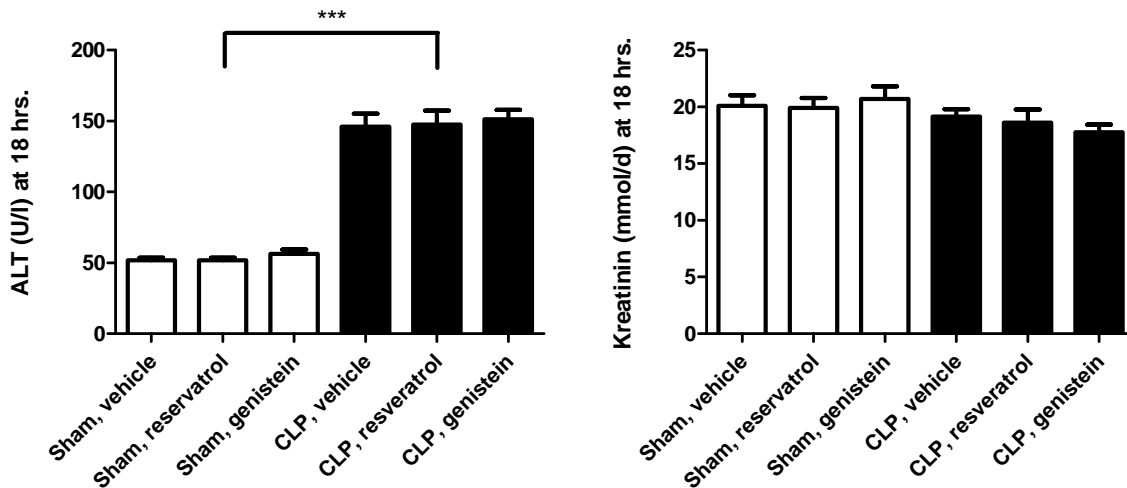
### **Resultater**

Bare primære endepunkter ble analysert, og det ble ikke funnet statistiske signifikante forskjeller mellom noen av undergruppene. Det lot seg gjøre å poole estimer til å skille to grupper; sham og CLP. Det presenteres her et utvalg av resultatene fra disse analysene:



- a) IL-6 og TNF- $\alpha$ , innhøstet 18 timer etter operasjon, viser en klar tendens til immunologisk aktivering i de fecalt affiserte rottene. Det er ingen signifikant forskjell mellom undergruppene i hver kategori, men en tydelig stigning i både IL-6 ( $p < 0,0001$ ) og TNF $\alpha$  ( $p < 0,0001$ ) hos sham sammenlignet med CLP-opererte dyr.





b) ALT og kreatinin, innhøstet 18 timer etter operasjon, viser ingen forskjell mellom de ulike undergrupper. Der er tegn til leverskade ( $p < 0,0001$ ) uten at nyrene synes så affektet at kreatinin har begynt å stige.

## Diskusjon

At resveratrol har en effekt ved induisert sepsis har tidligere vært dokumentert i litteraturen [38,62], og det samme gjelder til en viss grad for genistein [61]. Etter en gjennomgang av analysene foretatt av Klinisk kjemisk laboratorium (RH) (biokjemiske markører) og Lygstadaas et.al (cytokiner), viste det seg at det ikke kunne spores noen effekt i behandlingsgruppene hverken for cytokiner og biokjemiske markører. Dette gjorde at forskningsgruppen bestemte seg for å avslutte analysene istedenfor å bruke tid på å fullføre en omfattende protokoll, hvilket kan forklare at resultatene blir seende noe "sparsomme" ut. En forskjell som kunne observeres i IL-10 antas å ha vært en statistisk tilfeldighet, mer enn et uttrykk for en reel effekt isolert til dette cytokinet.

### Spekulasjoner rundt den manglende effekt

Vi anerkjenner at det er flere mulige årsaker til at den ønskede effekt uteble; først og fremst ble det på et svært tidlig tidspunkt besluttet å endre administrasjonsform fra intraperitoneal administrasjon til subcutane injeksjoner. I etterkant ser vi at dette kan ha vært en avgjørende feil. Det er uvisst om subcutane injeksjoner gir rotten god nok biotilgjengelighet av resveratrol og genistein til at disse kan utøve sin immunmodulerende virkning på knappe 18 timer. Vår studie kan peke i retning av en suboptimal absorpsjon av polyfenoler administrert på denne måten.

Andre potensielle feilskjær kan ha vært at reagensene vi brukte ble blandet feil, eller at vi ga for små doser resveratrol/genistein til å kunne fange opp en mulig effekt på kort tid. For kort eller for langt intervall fra polyfenoladministrasjon til registrering av virkningen er også en mulig årsak til at vi ikke kunne fange opp en eventuell effekt.

Sist, men ikke minst hadde innhøsterene initialt problemer med blodtappingsmetoden fra dyrene, derfor gikk en del resultater til spille tidlig i prosjektet. Dette bedret seg når innhøsterene mestret nye teknikker, men gir oss noe færre tall å støtte oss på, tross de mange dyrene som inngikk i studien.

### *Konklusjon*

Selv om den litteraturen som er tilgjengelig peker i retning av at dette skulle fungere, har denne studien gitt manglende resultater. Basert på den tilgjengelige litteraturen, antar vi at dette er et resultat av menneskelige og metodemessige feil mer enn polyfenolenes manglende effekt.

Initialt var denne oppgaven tiltenkt som et medforfatterskap i en publikasjon. Dette endret seg selvsagt når resultatene uteble, og man tenkte lenge på hvordan man skulle løse dette problemet. Vi endte med en beslutning om at det faktiske arbeidet tross alt var gjort, og at å kreve positive resultater neppe ville være påkrevet. Derfor havnet vi på en løsning der man fokuserte mer på en solid bakgrunn, for å kompensere for en noe tynnere resultatdel.

### III. Referanser

#### Reference List

1. M. Ariga, B. Neitzert, S. Nakae, G. Mottin, C. Bertrand, M.P. Pruniaux, S.L. Jin, and M. Conti, Nonredundant function of phosphodiesterases 4D and 4B in neutrophil recruitment to the site of inflammation, *J. Immunol.* 173 (2004) pp. 7531-7538.
2. D.M. Aronoff, C. Canetti, C.H. Serezani, M. Luo, and M. Peters-Golden, Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1, *J. Immunol.* 174 (2005) pp. 595-599.
3. D.M. Aronoff, J.K. Carstens, G.H. Chen, G.B. Toews, and M. Peters-Golden, Short communication: differences between macrophages and dendritic cells in the cyclic AMP-dependent regulation of lipopolysaccharide-induced cytokine and chemokine synthesis, *J. Interferon Cytokine Res.* 26 (2006) pp. 827-833.
4. A. Beretz, R. Anton, and J.C. Stoclet, Flavonoid compounds are potent inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase, *Experientia* 34 (1978) pp. 1054-1055.
5. A. Beretz, F. Briancon-Scheid, A. Stierle, G. Corre, R. Anton, and J.P. Cazenave, Inhibition of human platelet cyclic AMP phosphodiesterase and of platelet aggregation by a hemisynthetic flavonoid, amentoflavone hexaacetate, *Biochem. Pharmacol.* 35 (1986) pp. 257-262.
6. G. Bernardin, R.L. Kisoka, C. Delporte, P. Robberecht, and J.L. Vincent, Impairment of beta-adrenergic signaling in healthy peripheral blood mononuclear cells exposed to serum from patients with septic shock: involvement of the inhibitory pathway of adenylyl cyclase stimulation, *Shock* 19 (2003) pp. 108-112.
7. G. Bernardin, A.D. Strosberg, A. Bernard, M. Mattei, and S. Marullo, Beta-adrenergic receptor-dependent and -independent stimulation of adenylyl cyclase is impaired during severe sepsis in humans, *Intensive Care Med.* 24 (1998) pp. 1315-1322.
8. R.C. Bone, R.A. Balk, F.B. Cerra, R.P. Dellinger, A.M. Fein, W.A. Knaus, R.M. Schein, and W.J. Sibbald, Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992, *Chest* 136 (2009) p. e28.
9. J.L. Bos, Epac proteins: multi-purpose cAMP targets, *Trends Biochem. Sci.* 31 (2006) pp. 680-686.
10. M.C. Braun, J. He, C.Y. Wu, and B.L. Kelsall, Cholera toxin suppresses interleukin (IL)-12 production and IL-12 receptor beta1 and beta2 chain expression, *J. Exp. Med.* 189 (1999) pp. 541-552.

11. T. Bryn, M. Mahic, J.M. Enserink, F. Schwede, E.M. Aandahl, and K. Tasken, The cyclic AMP-Epac1-Rap1 pathway is dissociated from regulation of effector functions in monocytes but acquires immunoregulatory function in mature macrophages, *J. Immunol.* 176 (2006) pp. 7361-7370.
12. G. Buckland, A. Agudo, L. Lujan, P. Jakszyn, H.B. Bueno-de-Mesquita, D. Palli, H. Boeing, F. Carneiro, V. Krogh, C. Sacerdote, R. Tumino, S. Panico, G. Nesi, J. Manjer, S. Regner, I. Johansson, R. Stenling, M.J. Sanchez, M. Dorronsoro, A. Barricarte, C. Navarro, J.R. Quiros, N.E. Allen, T.J. Key, S. Bingham, R. Kaaks, K. Overvad, M. Jensen, A. Olsen, A. Tjønneland, P.H. Peeters, M.E. Numans, M.C. Ocke, F. Clavel-Chapelon, S. Morois, M.C. Boutron-Ruault, A. Trichopoulou, P. Lagiou, D. Trichopoulos, E. Lund, E. Couto, P. Boffeta, M. Jenab, E. Riboli, D. Romaguera, T. Mouw, and C.A. Gonzalez, Adherence to a Mediterranean diet and risk of gastric adenocarcinoma within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort study, *Am. J. Clin. Nutr.* (2009).
13. J.A. Buras, B. Holzmann, and M. Sitkovsky, Animal models of sepsis: setting the stage, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) pp. 854-865.
14. J. Cohen, The immunopathogenesis of sepsis, *Nature* 420 (2002) pp. 885-891.
15. D.M. Cooper and A.J. Crossthwaite, Higher-order organization and regulation of adenylyl cyclases, *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (2006) pp. 426-431.
16. R.T. Curnow, E.J. Rayfield, D.T. George, T.V. Zenser, and F.R. DeRubertis, Altered hepatic glycogen metabolism and glucoregulatory hormones during sepsis, *Am. J. Physiol* 230 (1976) pp. 1296-1301.
17. M.K. Dahle, A.E. Myhre, A.O. Aasen, and J.E. Wang, Effects of forskolin on Kupffer cell production of interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha differ from those of endogenous adenylyl cyclase activators: possible role for adenylyl cyclase 9, *Infect. Immun.* 73 (2005) pp. 7290-7296.
18. M.K. Dahle, P.K. Rissé, J.E. Wang, and A.O. Aasen, Cyclic adenosine monophosphate signaling and organ dysfunction in septic shock\*, *Journal of Organ Dysfunction* 5 (2009) pp. 38-50.
19. J.F. Dasta, Norepinephrine in septic shock: renewed interest in an old drug, *DICP.* 24 (1990) pp. 153-156.
20. N. Defer, M. Best-Belpomme, and J. Hanoune, Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase, *Am. J. Physiol Renal Physiol* 279 (2000) p. F400-F416.
21. E.A. Deitch, Rodent models of intra-abdominal infection, *Shock* 24 Suppl 1 (2005) pp. 19-23.
22. M. Delgado, J. Leceta, and D. Ganea, Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia, *J. Leukoc. Biol.* 73 (2003) pp. 155-164.

23. M. Dell'Agli, O. Maschi, G.V. Galli, R. Fagnani, C.E. Dal, D. Caruso, and E. Bosisio, Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase, *Br. J. Nutr.* 99 (2008) pp. 945-951.
24. R.P. Dellinger, M.M. Levy, J.M. Carlet, J. Bion, M.M. Parker, R. Jaeschke, K. Reinhart, D.C. Angus, C. Brun-Buisson, R. Beale, T. Calandra, J.F. Dhainaut, H. Gerlach, M. Harvey, J.J. Marini, J. Marshall, M. Ranieri, G. Ramsay, J. Sevransky, B.T. Thompson, S. Townsend, J.S. Vender, J.L. Zimmerman, and J.L. Vincent, Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008, *Crit Care Med.* 36 (2008) pp. 296-327.
25. A.M. El-Mowafy and M. Alkhalaf, Resveratrol activates adenylyl-cyclase in human breast cancer cells: a novel, estrogen receptor-independent cytostatic mechanism, *Carcinogenesis* 24 (2003) pp. 869-873.
26. C.T. Esmon, Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis?, *Crit Care Med.* 32 (2004) p. S219-S222.
27. J.E. Ferrell, Jr., P.D. Chang Sing, G. Loew, R. King, J.M. Mansour, and T.E. Mansour, Structure/activity studies of flavonoids as inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase and relationship to quantum chemical indices, *Mol. Pharmacol.* 16 (1979) pp. 556-568.
28. D.E. Fowler, S. Yang, M. Zhou, I.H. Chaudry, H.H. Simms, and P. Wang, Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1: their role in the septic response, *J. Surg. Res.* 109 (2003) pp. 175-181.
29. K.F. Gey, G.B. Brubacher, and H.B. Stahelin, Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer, *Am. J. Clin. Nutr.* 45 (1987) pp. 1368-1377.
30. S. Ghosh and M.S. Liu, Decrease in adenylate cyclase activity in dog livers during endotoxic shock, *Am. J. Physiol* 245 (1983) p. R737-R742.
31. F. Goto, T. Fujita, E. Otani, and M. Yamamuro, The effect of indomethacin and adrenergic receptor blocking agents on rats and canine responses to endotoxin, *Circ. Shock* 7 (1980) pp. 413-424.
32. J. Hanoune and N. Defer, Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41 (2001) pp. 145-174.
33. C.L. Holmes, B.M. Patel, J.A. Russell, and K.R. Walley, Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock, *Chest* 120 (2001) pp. 989-1002.
34. R.S. Hotchkiss and I.E. Karl, The pathophysiology and treatment of sepsis, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) pp. 138-150.
35. W.J. Hubbard, M. Choudhry, M.G. Schwacha, J.D. Kerby, L.W. Rue, III, K.I. Bland, and I.H. Chaudry, Cecal ligation and puncture, *Shock* 24 Suppl 1 (2005) pp. 52-57.

36. S.L. Jin, L. Lan, M. Zoudilova, and M. Conti, Specific role of phosphodiesterase 4B in lipopolysaccharide-induced signaling in mouse macrophages, *J. Immunol.* 175 (2005) pp. 1523-1531.
37. W.C. Ko, C.M. Shih, Y.H. Lai, J.H. Chen, and H.L. Huang, Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships, *Biochem. Pharmacol.* 68 (2004) pp. 2087-2094.
38. M. Kolgazi, G. Sener, S. Cetinel, N. Gedik, and I. Alican, Resveratrol reduces renal and lung injury caused by sepsis in rats, *J. Surg. Res.* 134 (2006) pp. 315-321.
39. Y. Landry, N. Niederhoffer, E. Sick, and J.P. Gies, Heptahelical and other G-protein-coupled receptors (GPCRs) signaling, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) pp. 51-63.
40. S.Q. Latifi, M.A. O'Riordan, and A.D. Levine, Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock, *Infect. Immun.* 70 (2002) pp. 4441-4446.
41. S.B. Lotito and B. Frei, Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon?, *Free Radic. Biol. Med.* 41 (2006) pp. 1727-1746.
42. L.M. Luttrell, Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors, *Methods Mol. Biol.* 332 (2006) pp. 3-49.
43. G.S. Martin, D.M. Mannino, S. Eaton, and M. Moss, The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) pp. 1546-1554.
44. A. Mente, K.L. de, H.S. Shannon, and S.S. Anand, A systematic review of the evidence supporting a causal link between dietary factors and coronary heart disease, *Arch. Intern. Med.* 169 (2009) pp. 659-669.
45. M. Niemialtowski, W. Klucinski, K. Malicki, and I.S. de Faundez, Cholera toxin (cholera toxin)-polymorphonuclear leukocyte interactions: effect on migration in vitro and Fc gamma R-dependent phagocytic and bactericidal activity, *Microbiol. Immunol.* 37 (1993) pp. 55-62.
46. M.S. O'Dorisio, G.R. Vandenbark, and A.F. LoBuglio, Human monocyte killing of *Staphylococcus aureus*: modulation by agonists of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate, *Infect. Immun.* 26 (1979) pp. 604-610.
47. S. Okano, M. Tagawa, N. Urakawa, and R. Ogawa, Effect of dibutyryl cyclic AMP on hemodynamics and chemical mediators in dogs with experimentally-induced endotoxic shock, *J. Vet. Med. Sci.* 55 (1993) pp. 1001-1004.
48. K. Omori and J. Kotera, Overview of PDEs and their regulation, *Circ. Res.* 100 (2007) pp. 309-327.
49. S.J. Parker and P.E. Watkins, Experimental models of gram-negative sepsis, *Br. J. Surg.* 88 (2001) pp. 22-30.

50. B. Pavan, C. Biondi, and A. Dalpiaz, Adenylyl cyclases as innovative therapeutic goals, *Drug Discov. Today* 14 (2009) pp. 982-991.
51. M.R. Peluso, Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver, *Exp. Biol. Med.* (Maywood. ) 231 (2006) pp. 1287-1299.
52. F.R. Perez-Lopez, P. Chedraui, J. Haya, and J.L. Cuadros, Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions, *Maturitas* 64 (2009) pp. 67-79.
53. A. Petroni, M. Blasevich, M. Salami, N. Papini, G.F. Montedoro, and C. Galli, Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil, *Thromb. Res.* 78 (1995) pp. 151-160.
54. S. Pierre, T. Eschenhagen, G. Geisslinger, and K. Scholich, Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets, *Nat Rev. Drug Discov.* 8 (2009) pp. 321-335.
55. A.A. Quartin, R.M. Schein, D.H. Kett, and P.N. Peduzzi, Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group, *JAMA* 277 (1997) pp. 1058-1063.
56. R. Rahimi, S. Ghiasi, H. Azimi, S. Fakhari, and M. Abdollahi, A review of the herbal phosphodiesterase inhibitors; future perspective of new drugs, *Cytokine* 49 (2010) pp. 123-129.
57. D.G. Remick, D.E. Newcomb, G.L. Bolgos, and D.R. Call, Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture, *Shock* 13 (2000) pp. 110-116.
58. D. Rittirsch, M.S. Huber-Lang, M.A. Flierl, and P.A. Ward, Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture, *Nat. Protoc.* 4 (2009) pp. 31-36.
59. C.M. Robertson and C.M. Coopersmith, The systemic inflammatory response syndrome, *Microbes. Infect.* 8 (2006) pp. 1382-1389.
60. M. Ruckstuhl and Y. Landry, Inhibition of lung cyclic AMP- and cyclic GMP-phosphodiesterases by flavonoids and other chromone-like compounds, *Biochem. Pharmacol.* 30 (1981) pp. 697-702.
61. H. Ruetten and C. Thiemermann, Effects of tyrphostins and genistein on the circulatory failure and organ dysfunction caused by endotoxin in the rat: a possible role for protein tyrosine kinase, *Br. J. Pharmacol.* 122 (1997) pp. 59-70.
62. H. Sebai, M. Ben-Attia, M. Sani, E. Aouani, and N. Ghanem-Boughanmi, Protective effect of resveratrol in endotoxemia-induced acute phase response in rats, *Arch. Toxicol.* 83 (2009) pp. 335-340.
63. C.H. Serezani, M.N. Ballinger, D.M. Aronoff, and M. Peters-Golden, Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39 (2008) pp. 127-132.

64. C.H. Serezani, M.N. Ballinger, D.M. Aronoff, and M. Peters-Golden, Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39 (2008) pp. 127-132.
65. D.E. Stevenson and R.D. Hurst, Polyphenolic phytochemicals--just antioxidants or much more?, *Cell Mol. Life Sci.* 64 (2007) pp. 2900-2916.
66. K. Tasken and E.M. Aandahl, Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A, *Physiol Rev.* 84 (2004) pp. 137-167.
67. van der Pouw Kraan TC, L.C. Boeije, R.J. Smeenk, J. Wijdenes, and L.A. Aarden, Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production, *J. Exp. Med.* 181 (1995) pp. 775-779.
68. D. Vanden Broeck, C. Horvath, and M.J. De Wolf, *Vibrio cholerae*: cholera toxin, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) pp. 1771-1775.
69. F. Ververidis, E. Trantas, C. Douglas, G. Vollmer, G. Kretzschmar, and N. Panopoulos, Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health, *Biotechnol. J.* 2 (2007) pp. 1214-1234.
70. K.A. Wichterman, A.E. Baue, and I.H. Chaudry, Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal, *J. Surg. Res.* 29 (1980) pp. 189-201.
71. R.J. Williams, J.P. Spencer, and C. Rice-Evans, Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?, *Free Radic. Biol. Med.* 36 (2004) pp. 838-849.
72. T. Yanase, K. Enzan, H. Mitsuhashi, and T. Horiguchi, Dibutyl cAMP improves systemic vasoconstriction caused by endotoxin in dogs, *Shock* 5 (1996) pp. 284-288.
73. T.V. Zenser, F.R. DeRubertis, D.T. George, and E.J. Rayfield, Infection-induced hyperglucagonemia and altered hepatic response to glucagon in the rat, *Am. J. Physiol* 227 (1974) pp. 1299-1305.